

藏药麻花秦艽醇提物对胶原诱导型关节炎模型小鼠滑膜组织中NF-κB p65表达的影响^Δ

贾 娜*,崔 佳,文爱东[#](空军军医大学西京医院药剂科,西安 710032)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2082-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.15

摘 要 目的:考察藏药麻花秦艽醇提物(GSM)对胶原诱导型关节炎(CIA)模型小鼠滑膜组织中核转录因子κB p65(NF-κB p65)表达的影响,为阐明其抗类风湿关节炎(RA)的作用机制提供参考。方法:将40只小鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组(阳性对照,0.25 mg/kg)和GSM低、高剂量组(25、50 mg/kg,以生药量计),每组8只。除正常组外,其余各组小鼠均于尾根部多点皮内注射鸡Ⅱ型胶原制备CIA模型。自造模当日起,给药组小鼠每天灌胃相应药物1次,正常组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水,连续给药28 d。给药后7、14、21、28、35 d,测定各组小鼠的关节炎指数(AI);给药结束后,测定各组小鼠的脾指数和胸腺指数,采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6和肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平,苏木精-伊红染色后观察小鼠踝关节滑膜组织病理学变化,并采用Western blot法检测小鼠滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠在给药不同时间后的AI值、脾指数、胸腺指数、血清中炎症因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)以及滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);小鼠踝关节滑膜组织出现细胞排列密集且紊乱、滑膜细胞数量增加、充血等病理学变化。与模型组比较,除GSM低剂量组小鼠在给药7、14 d的AI值降低不显著外,各给药组小鼠其余指标水平均显著降低($P<0.05$);各给药组小鼠踝关节滑膜组织的充血程度减轻、炎性细胞数量减少。结论:GSM可能通过降低血清中炎症因子水平,抑制滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达,进一步减轻滑膜炎症状而发挥其抗RA的作用。

关键词 藏药;麻花秦艽醇提物;胶原诱导型关节炎;小鼠;核转录因子κB p65

Effects of Ethanol Extract of Tibetan Medicine *Gentiana stramine* on the Expression of NF-κB p65 in Synovial Tissue of Collagen-induced Arthritis Model Mice

JIA Na, CUI Jia, WEN Aidong (Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of the ethanol extract of Tibetan medicine *Gentiana straminea* (GSM) on the expression of NF-κB p65 in synovial tissue of collagen-induced arthritis (CIA) model mice, and to provide a reference for elucidating the action mechanism of its anti-rheumatoid arthritis (RA). METHODS: Totally 40 mice were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group (positive drug, 0.25 mg/kg) and GSM low-dose and high-dose groups (25, 50 mg/kg, calculated by crude drug), with 8 mice in each group. Except for normal group, other groups were given intradermal injection of Chicken type II collagen intracutaneously via tail to induce CIA model. After modeling, medication group was given relevant medicine intragastrically once a day, and normal group and model group were given same amount of normal saline intragastrically for consecutive 28 d. The arthritis index (AI) of mice were determined 7, 14, 28, 35 d after medication. After last medication, the spleen index and thymus index of mice were determined; ELISA was used to measure the serum levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α; Pathological change of synovial tissue in ankle joint of mice was observed by HE staining; Western blot was used to detect the protein expression of NF-κB p65 in synovial tissue of mice. RESULTS: Compared with normal group, the levels of AI value after different medication time, and spleen index, thymus index, serum inflammatory factors (IL-1β, IL-6, TNF-α) and protein expression of NF-κB p65 in synovial tissue were increased significantly in model group ($P<0.05$). Pathological changes of synovial tissue in mice were observed, such as dense and disorder cell arrangement, the increase of synovial cells, hyperemia. Compared with model group, decrease of AI was not significant in GSM low-dose group 7, 14 d after medication, and other indexes of medication groups were all decreased significantly ($P<0.05$). The inflammatory cell hyperplasia and the number of inflammatory cells were decreased in medication groups. CONCLUSIONS: GSM can inhibit the protein expression of NF-κB p65

in synovial tissue and relieve synovial inflammation and play its role on the anti RA by reducing the levels of serum inflammatory factors.

KEYWORDS Tibetan medicine; Ethanol extract of *Gentiana stramine*; Collagen-induced arthritis; Mice; NF-κB p65

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81403159)
* 主管药师,硕士。研究方向:中药药效物质、免疫药理学。电话:029-84775454。E-mail:jiana10.28@163.com
通信作者:主任药师,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质、药理学。电话:029-84775454。E-mail:papadwen@outlook.com

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、对称性、关节滑膜炎为特点的全身免疫性疾病,主要表现为关节肿痛、软骨破坏和关节强直畸形,使关节功能严重受损,以致劳动力丧失。RA的致残率较高,严重影响了患者的身体健康。藏药麻花秦艽(*Gentiana straminea* Maxim.)属龙胆科龙胆属植物^[1],分布于我国西藏各地以及青海、甘肃等高海拔地区,藏医称之为“吉解嘎保”,以花入药,具有清热、舒筋止痛之功效,主要用于RA的治疗^[2]。据文献报道,麻花秦艽醇提物(GSM)可减轻佐剂性关节炎大鼠的足肿胀,并可降低其异常升高的脏器指数^[3]。本研究在此基础上,构建胶原诱导型关节炎(CIA)小鼠模型,观察GSM对CIA模型小鼠关节炎指数(AI)和踝关节滑膜组织病理学的影响,并通过对小鼠血清及关节组织中生化指标的检测进一步探讨其抗RA的分子机制,为GSM的药物研发及临床应用提供更充分的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

TE612-L型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo科技公司);BX43-12P01型光学显微镜(日本Olympus光学工业株式会社)。

1.2 药品与试剂

麻花秦艽购自青海西宁,经西北大学胡正海教授鉴定为麻花秦艽的花,样品存放于西北大学陕西省生物医药重点实验室;醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:140008,规格:每片0.75 mg);鸡Ⅱ型胶原(美国Sigma公司,批号:200202);弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(美国Chondrex公司,批号:均为F5881,纯度:均为99%);兔抗核转录因子 κ B p65(NF- κ B p65)抗体(英国Abcam公司,批号:ab131485);羊抗兔辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZDR-5306);兔抗p84N5抗体(内参物,美国GeneTex公司,批号:C1C3);小鼠白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国R&D公司,批号分别为:M1000B、M6000B、MTA00B);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康清洁级C57BL/6J小鼠40只,♂,10~14周龄,由空军军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2007-0007。购入后将小鼠分笼饲养,饲养室温度为20~25℃、湿度为40%~60%,饲养期间小鼠自由摄食饮水。本研究所涉及的动物相关操作均在北京医院伦理委员会的批准下进行(伦理批准号:XJYYLL-2014302)。

2 方法

2.1 GSM的制备

将阴干的麻花秦艽200 g粉碎,过20目筛,用少量

75%甲醇拌匀并浸泡12 h,待其润胀后用75%乙醇进行渗漉提取,薄层色谱(TLC)下检视,直至薄层板上几乎看不到斑点时停止渗漉。合并提取液,减压回收溶剂至无醇味,最后将提取液浓缩成浸膏状,即得GSM(经高效液相色谱法测定,提取物中龙胆苦苷含量为48.09%、落苷酸含量为14.63%、獐牙菜苷含量为9.18%、獐牙菜苦苷含量为12.42%)。将所制GSM密封,灭菌,于4℃冰箱中冷藏,备用。

2.2 CIA模型的建立

将鸡Ⅱ型胶原溶解于0.1 mol/L的冰醋酸中,制成质量浓度为4 mg/mL的溶液,于4℃放置过夜。将溶解的鸡Ⅱ型胶原与弗氏完全佐剂等体积混合,冰浴中使用匀浆器充分乳化制成乳剂(将乳化好的乳剂滴至放有水的烧杯中不会扩散),全程无菌操作。免疫动物时,在小鼠尾根部多点皮内注射0.1 mL乳剂。基础免疫后第14天,取同样量的乳剂再加强注射1次,避开初次免疫部位^[4];同时,正常组小鼠注射等体积生理盐水。从造模当天开始观察并记录小鼠AI,7 d观察记录1次,共观察5次。

2.3 分组与给药

小鼠适应性喂养1周后随机分为5组,每组8只,分别为正常组、模型组、地塞米松组(阳性对照,0.25 mg/kg)^[5]和GSM低、高剂量组(25、50 mg/kg,参考文献[5]并结合预实验结果综合确定给药剂量)。除正常组外,其余各组小鼠均按照“2.2”项下方法建立CIA模型,并从造模当天开始灌胃相应药物,正常组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水,每天给药1次,连续给药28 d。

2.4 AI评估

采用5级评分法进行AI评估^[6]:无红肿为0分;小趾关节红肿为1分;趾关节和足跖肿胀为2分;踝关节以下足爪肿胀为3分;含踝关节在内的全部足爪肿胀为4分。

2.5 血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平测定

给药结束1周后,小鼠腹主动脉取血,然后将血液以3 000 r/min离心15 min,取上清,备用。分别按照相应ELISA试剂盒操作说明测定血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。

2.6 胸腺指数和脾指数测定

取血完成后,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(65 mg/kg)处死。解剖小鼠摘取胸腺和脾,称湿质量,按公式计算胸腺指数和脾指数:胸腺指数(脾指数)=胸腺(脾)质量(mg)/体质量(g)×10。

2.7 踝关节滑膜组织病理学观察

取各组小鼠右后踝关节组织,以4%多聚甲醛固定,10%乙二胺四乙酸脱钙,常规脱水、石蜡包埋后,行5 μ m切片,苏木精-伊红常规染色,然后在光学显微镜下观察各组小鼠踝关节滑膜组织病理学改变。

2.8 踝关节滑膜组织中NF- κ B p65蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行测定。将小鼠踝关节滑膜组织置于匀浆器中,冰上研磨提取组织总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。取50 μ g蛋白上样,

进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(5%的浓缩胶恒压80 V、25 min,15%的分离胶恒压120 V、40 min),恒流150 A转膜2 h,脱脂奶粉封闭2 h;加入NF-κB p65、β-actin(内参物)一抗(1:1 000),4 ℃孵育过夜;然后用TBST缓冲液洗膜15 min,共3次;加入二抗(1:1 200),室温条件下孵育2 h;TBST缓冲液洗膜15 min,共3次;加入显影液1 mL(1:1),放入化学发光仪检测。采用Quantity One软件对显影出的条带进行灰度值分析,以NF-κB p65与β-actin条带灰度值的比值表示NF-κB p65的相对表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AI评估结果

与正常组比较,模型组小鼠的AI值显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠的AI值均有所降低,且地塞米松组和GSM高剂量组小鼠从给药14 d开始、GSM低剂量组小鼠从给药21 d开始的AI值显著降低($P < 0.05$)。给药不同时间后各组小鼠AI值测定结果见表1。

表1 给药不同时间后各组小鼠的AI值测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 1 Determination results of AI of mice in each group after different medication time ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量, mg/kg	给药时间,d				
		7	14	21	28	35
正常组		0	0	0	0	0
模型组		2.3±0.4*	3.8±0.5*	11.63±0.6*	12.0±0.4*	12.0±0.4*
地塞米松组	0.25	2.2±0.1	2.9±0.4 [#]	3.6±0.5 [#]	3.7±0.3 [#]	4.5±0.8 [#]
GSM高剂量组	50	2.1±0.8	3.1±0.6 [#]	4.4±0.4 [#]	4.6±0.7 [#]	5.0±0.6 [#]
GSM低剂量组	25	2.2±0.9	3.6±0.7	8.9±0.5 [#]	9.4±0.7 [#]	9.6±0.5 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$
Note:vs. normal group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

3.2 血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平测定结果

与正常组比较,模型组小鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-6水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平均显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平测定结果见表2。

3.3 胸腺指数和脾指数测定结果

与正常组比较,模型组小鼠胸腺指数和脾指数显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠胸腺指数和脾指数均显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠胸腺指数和脾指数测定结果见表3。

3.4 踝关节滑膜组织病理学观察结果

在光学显微镜下可见正常组小鼠踝关节滑膜组织排列整齐,未见充血、水肿、炎性细胞浸润等现象,未见

表2 各组小鼠血清中IL-1β、IL-6和TNF-α水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/mL}$)

Tab 2 Determination results of serum levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/mL}$)

组别	剂量,mg/kg	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常组		26.69±1.91	85.59±6.98	15.59±3.02
模型组		111.70±7.20*	390.92±10.72*	78.90±1.30*
地塞米松组	0.25	78.95±3.55 [#]	278.15±10.85 [#]	64.65±7.35 [#]
GSM高剂量组	50	44.52±3.41 [#]	141.25±9.45 [#]	39.13±2.67 [#]
GSM低剂量组	25	56.09±5.87 [#]	167.78±10.58 [#]	45.21±8.01 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$
Note:vs. normal group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

表3 各组小鼠胸腺指数和脾指数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 3 Determination results of thymus index and spleen index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量,mg/kg	胸腺指数	脾指数
正常组		2.29±0.02	1.22±0.01
模型组		3.24±0.02*	1.92±0.02*
地塞米松组	0.25	2.60±0.04 [#]	1.37±0.02 [#]
GSM高剂量组	50	2.81±0.03 [#]	1.51±0.01 [#]
GSM低剂量组	25	2.87±0.01 [#]	1.64±0.03 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$
Note:vs. normal group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

滑膜细胞增生及血管翳形成。与正常组比较,模型组小鼠踝关节滑膜组织中细胞排列密集且凌乱,滑膜组织细胞数量较多,出现充血及大量炎性细胞,可观察到淋巴细胞。与模型组比较,地塞米松组和GSM高剂量组小鼠踝关节滑膜组织充血及炎性细胞数量明显减少,但GSM低剂量组小鼠滑膜组织病理变化不明显。各组小鼠踝关节滑膜组织病理学观察结果见图1。

3.5 踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白水平测定结果

与正常组比较,模型组小鼠踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白水平均显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达电泳图见图2,测定结果见表4。

4 讨论

RA是一种以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫疾病,滑膜炎持久反复发作引起关节软骨破坏。地塞米松为治疗RA的临床常用药物,故本研究以其为阳性对照。NF-κB是介导炎症反应的重要信号通路,在RA滑膜炎的病理过程中起关键作用^[7]。而NF-κB主要由p65和p50两个亚单位组成,参与调节体内的细胞因子、炎症分子以及各种受体和蛋白的表达。其中p50很少有其他序列,而p65则有250个氨基酸残基的C-末端,内含2~3个独立的转录活性区,并且p65的另一个重要功能是与NF-κB的上游调节信号分子NF-κB抑制剂结合^[8]。当NF-κB被其上游分子激活后将由胞质转移到细胞核中,与相应位点结合后启动基质金属蛋白酶的转录,同时参与许多前炎症递质分子转录的调控,包括细胞因子、黏

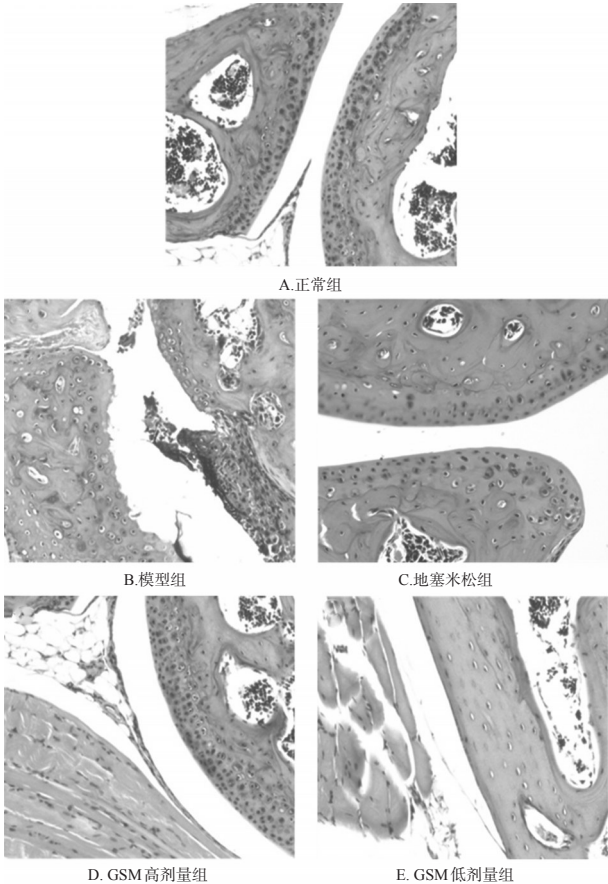


图1 各组小鼠踝关节滑膜组织病理学变化观察结果(HE,×200)

Fig 1 Pathological changes of synovial tissue in ankle joint of mice in each group(HE,×200)

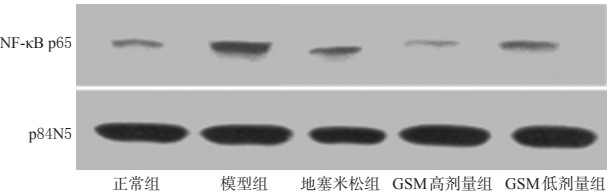


图2 各组小鼠踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophorogram of NF-κB p65 of synovial tissues in ankle joint of mice in each group

表4 各组小鼠踝关节滑膜组织中NF-κB p65蛋白表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Determination results of NF-κB p65 protein expression of synovial tissue in ankle joint of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	NF-κB p65
正常组		1
模型组		3.2±0.1 [*]
地塞米松组	0.25	2.2±0.09 [#]
GSM高剂量组	50	1.8±0.04 [#]
GSM低剂量组	25	2.6±0.08 [#]

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. normal group, ^{*} $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

附分子、趋化因子、炎症因子(TNF-α、IL-1、IL-6)等,导致关节软骨破坏,介导滑膜炎反应的发生^[9]。研究表明,NF-κB活化后可升高IL-1β、TNF-α、IL-6等炎症因子的转录水平,同时NF-κB的活化又是许多炎症介质(如TNF-α、IL-1β等)表达增强的正反馈结果,导致RA炎症反应和结构破坏得以维持与进展^[10]。

麻花秦艽是龙胆科龙胆属植物,有效成分主要为环烯醚萜苷类及黄酮类化合物,有多种药理作用,藏医用于治关节炎、肺病发烧、黄疸及二便不通等^[11-12]。本课题组前期研究发现,GSM能够抑制二甲苯致大鼠耳肿胀,在3种经典镇痛实验(热板法、甩尾法和醋酸扭体法)中具有显著的镇痛作用^[5]。本研究进一步研究了GSM对CIA模型小鼠的改善作用及其机制。实验结果显示,GSM能够降低CIA小鼠的AI值,改善CIA小鼠的踝关节组织病理学变化,抑制血清中炎症因子(IL-1β、IL-6和TNF-α)水平,降低关节滑膜组织中NF-κB p65的蛋白表达水平,从而减轻滑膜炎,发挥抗RA的疗效。但是麻花秦艽中发挥作用的具体药效成分仍有待进一步考察。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:253-254.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:藏药卷[S].上海:上海科学技术出版社,2002:312.

[3] 赵勤,王乐乐,魏立鹏,等.麻花秦艽醇提物对佐剂性关节炎大鼠的影响[J].中药药理与临床,2015,31(1):145-147.

[4] JULIA JI,EGLE S,FIONA EM,et al. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice[J]. Nat Protoc,2008,3(4):612-619.

[5] JIA N,LI Y,WU Y,et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of Gentiana macrophylla Pall. and Gentiana straminea Maxim, and identification of their active constituents[J]. J Ethnopharmacol,2012,144(3):638-645.

[6] 张丽,张一云,符洪,等.黎药除湿祛风汤对鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2016,27(22):3088-3090.

[7] OKAMOTO T. NF-kappaB and rheumatic diseases[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets,2006,6(4):359-372.

[8] HAYDEN MS, WEST AP, GHOSH S. NF-κB and the immune response[J]. Oncogene,2006,25(51):6758-6780.

[9] 王洁,王亚南,陆妍,等.藤莓汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜PPARγ/NF-κB信号途径的影响[J].中国中西医结合杂志,2017,37(4):458-463.

[10] 汪永忠,邓龙飞,韩燕全,等.成纤维样滑膜细胞原代培养及其在类风湿关节炎治疗机制研究中的应用进展[J].中国药房,2016,27(7):966-969.

[11] 杨永昌.藏药志[S].西宁:青海人民出版社,1991:820.

[12] 张莉,党军,梅丽娟,等.藏药麻花秦艽化学成分研究[J].中草药,2016,39(1):103-106.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-03-19)

(编辑:林 静)